



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

DISEÑO BASADO EN LA ESTRUCTURA.
FUNDAMENTOS Y UN CASO PRÁCTICO.

Autor: José Manuel de la Torre Moreno

D.N.I.: 51142215J

Tutor: Mercedes Villacampa Sanz

Convocatoria: Febrero 2016

ÍNDICE

Índice de abreviaturas, 3

Resumen, 4

Introducción y Antecedentes, 4

Objetivos, 11

Metodología, 12

Resultados y Discusión, 17

Conclusiones, 19

Bibliografía, 20

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EA: Enfermedad de Alzheimer.

ACh: acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa.

BuChE: Butirilcolinesterasa.

GSK3 β : Glucógeno Sintasa Kinasa 3 beta.

β A: Beta Amiloide.

Nrf2: Factor de transcripción Nuclear eritroide 2.

NFTs: Ovillos Neurofibrilares intracelulares.

ARE: Elementos de Respuesta Antioxidantes.

CAS: Sitio Activo Catalítico.

PAS: Sitio Aniónico Periférico.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno.

APP: Proteína Precursora de Amieloide.

PS-1: Presenilina-1.

PS-2: Presenilina-2.

SBDD: Diseño de Fármacos Basado en la Estructura.

vHTS: virtual Hight-Troughput Screening o screening virtual de alto rendimiento.

Å: Amstrongs

RESUMEN

El diseño de fármacos basado en la estructura (Structure-Based Drug Design, SBDD) es un método computacional que está cobrando cada vez mayor relevancia en la búsqueda de moléculas con actividad biológica. Este método hace uso de la estructura tridimensional de la diana biológica, obtenida por estudios de cristalografía de difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear, para determinar las características del sitio de unión (centro activo/alostérico) del ligando, de tal manera que se pueda diseñar una estructura química a medida, que se adapte a dicho sitio y establezca una buena interacción con él. Para ello es imprescindible conocer las zonas de la diana implicadas en la unión con el ligando natural.

En este trabajo se describen los fundamentos y metodología del diseño de fármacos basado en la estructura. También se incluye un caso práctico de diseño racional basado en la estructura de un inhibidor enzimático. Se han elegido como dianas las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), dada el importante papel que desempeñan en la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad se caracteriza por una destrucción progresiva de neuronas colinérgicas a nivel del sistema nervioso central. Una de las causas de esta muerte neuronal es la formación de placas del péptido β -amiloide (β A). Se ha demostrado que las enzimas AChE y BuChE, a través de un sitio periférico aniónico, aceleran la formación de las placas seniles. El objetivo de la inhibición es doble: frenar la formación de placas de β A y a su vez, disminuir la degradación de acetilcolina (ACh).

INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

I. Diseño de Fármacos Basado en la Estructura (SBDD)

La determinación de las estructuras tridimensionales de muchas dianas biológicas, (proteínas en su mayor parte) y en especial de sus complejos con un ligando (agonista, antagonista o inhibidor) por cristalografía de difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear, ha permitido obtener información detallada de las interacciones entre dichas dianas y sus ligandos. Estas estructuras tridimensionales se encuentran recogidas en bases de datos como Protein Data Bank (PDB) y Cambridge Structural Database (CSD). Este hecho, unido al gran desarrollo de la química computacional en los últimos años, ha contribuido al avance del diseño racional de fármacos. Así, a partir de un modelo hipotético acerca del mecanismo de acción frente a una diana determinada, la química computacional permite identificar y

optimizar compuestos de elevada afinidad como potenciales candidatos a fármacos frente a dicha diana.

Cuando la estructura de la diana es conocida, la información acerca de la estructura atómica del centro de unión permite plantear nuevas aproximaciones al diseño de fármacos. Así, es posible identificar compuestos (hits) que, aún teniendo una actividad moderada aporten una estructura química novedosa no explorada. Además, el conocimiento estructural de la diana permite la introducción de cambios estructurales en el ligando con objeto de optimizar su afinidad y selectividad. La identificación de hits está directamente asociada al desarrollo de técnicas de docking, que permiten llevar a cabo el filtrado (screening) virtual de librerías de compuestos para seleccionar aquellos ligandos capaces de situarse de forma óptima en el centro de unión, así como de poder clasificarlos en función de afinidad potencial (scoring).

El diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD) es un método que se basa en el conocimiento de la estructura tridimensional de la diana biológica y es una de las aplicaciones computacionales que puede utilizarse en las fases iniciales del descubrimiento de fármacos.

El diseño racional comienza con la identificación y validación de la estructura de la diana (target), generalmente una proteína. Su estructura 3D se obtiene de la correspondiente base de datos. El siguiente paso es la identificación del centro activo de la diana. Si la base de datos dispone de la estructura tridimensional del complejo de la diana con un ligando, el estudio del centro activo se facilita ya que en dicha estructura se pueden identificar los residuos de la proteína que interaccionan con el ligando y el tipo de interacciones que establece con el mismo.

Si sólo se dispone de la estructura 3D de la diana, hay que proceder a identificar el sitio activo y, a continuación, ensayar una serie de grupos químicos para ver si establecen interacciones con el supuesto sitio de unión. Una vez identificados estos grupos se enlazan mediante el empleo de conectores (linkers) para obtener las correspondientes moléculas que, en principio, presentan afinidad por la diana (hits). El método, que continúa con el refinamiento de estas moléculas con el fin de aumentar su afinidad por la diana, debe conducir a un compuesto específico con alta afinidad y que, además, forme un complejo estable con la diana (compuesto cabeza de serie o lead).

El objetivo es descartar numerosas posibilidades y centrarse en las más exitosas combinaciones de estrategias y herramientas para encontrar el cabeza de serie de la manera

más eficiente posible. Esto supone un ahorro crucial en tiempo y dinero. Por ello, ha sido utilizado y aceptado ampliamente como una parte esencial de la búsqueda de fármacos.

Después se debe optimizar la estructura de la proteína, determinar su centro activo o sitio alostérico, optimizar la estructura activa y realizar el reconocimiento del sitio de unión.

El descubrimiento del cabeza de serie se puede conseguir mediante dos estrategias:

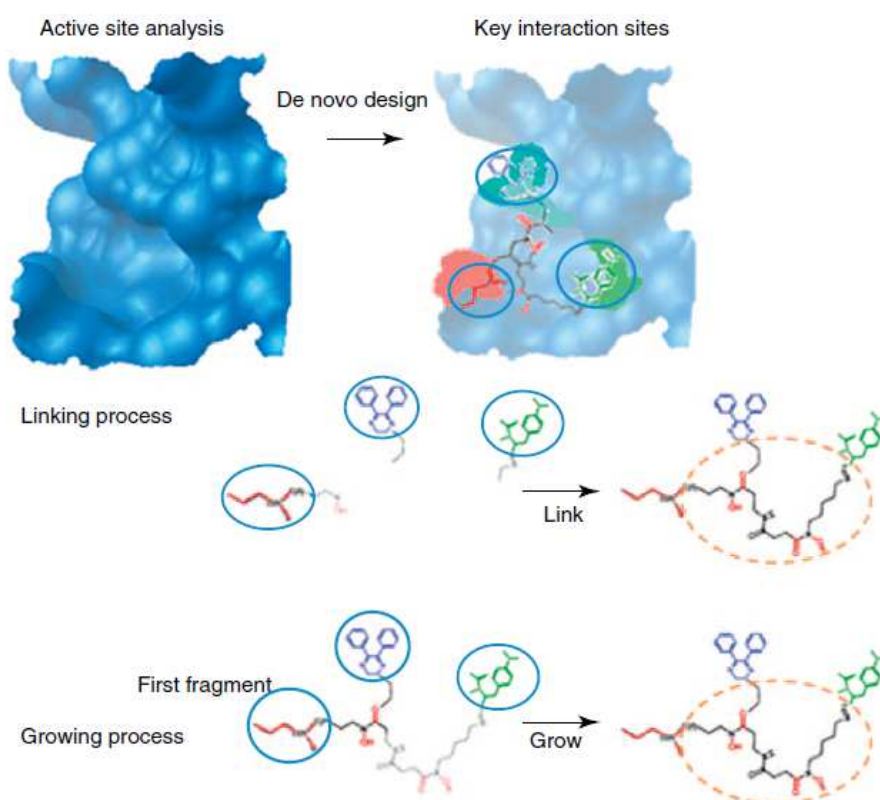
- Cribado virtual de alto rendimiento (virtual High-Throughput Screening, vHTS). Técnica computacional para buscar compuestos en librerías de moléculas pequeñas. Los compuestos son filtrados en

base a su energía de unión respecto a la diana o target.

- Diseño de novo, proceso que consiste en crear o construir un ligando desde un pequeño grupo químico dentro del espacio del sitio activo. De pequeñas moléculas se consiguen estructuras químicas que encajan mejor en el espacio del centro activo y contiene en su estructura los grupos químicos necesarios para la unión. Se diseña así un

fármaco a la medida, en función de las características electrónicas y topológicas del sitio de unión. Éste es el método que se ha empleado para el desarrollo del caso práctico de este trabajo.

Una vez seleccionados o diseñados los ligandos, el siguiente paso son los estudios de docking. El docking es un método para predecir la conformación y orientación preferida de una molécula con respecto a la proteína cuando ambas se unen para formar un complejo estable. La interacción entre el ligando y la estructura de la proteína se podría representar como el modelo "mano y guante". Se generan una serie de diferentes conformaciones (poses) para cada molécula. El proceso se completa con la evaluación de la afinidad que tienen las



distintas conformaciones del ligando por la diana (scoring), basada en las energías de unión calculadas.

El caso práctico, que se va a realizar según este método computacional, consiste en diseñar de novo un ligando inhibidor de unas enzimas que participan de procesos patogénicos en la enfermedad del Alzheimer. Para entender la utilidad de esta inhibición es necesario situarse en el contexto de la enfermedad.

II. Enfermedad del Alzheimer

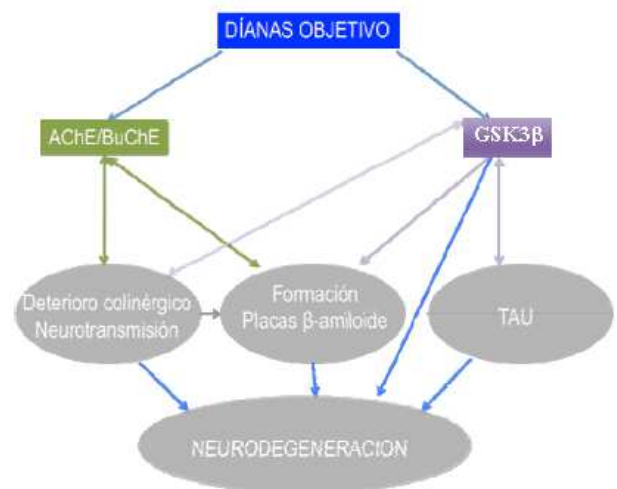
La enfermedad del Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que afecta a más de 36 millones de personas a nivel mundial, por lo que representa uno de los mayores retos para la salud pública. Debido al progresivo envejecimiento de la población, se prevé que el número de pacientes alcance los 115 millones en el año 2050. La ingente carga emocional que esta enfermedad supone tanto para los pacientes como para sus familiares, unida a los enormes costes socio-sanitarios para los sistemas de salud, ponen de manifiesto la imperante necesidad de encontrar nuevos tratamientos que permitan, no sólo aliviar sus síntomas, sino también detener su avance, frenando las causas que lo provocan.

Los principales signos clínicos de la EA son la pérdida gradual de memoria y un notable deterioro de las capacidades cognitivas, por la disminución progresiva del número de neuronas, sobre todo del sistema colinérgico.

Las características de la enfermedad a nivel histopatológico son:

- La formación de placas extracelulares del péptido β -amiloide (β A).
- La formación de ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs) constituidos por acúmulos de la proteína tau hiperfosforilada.
- Otras características: disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación.

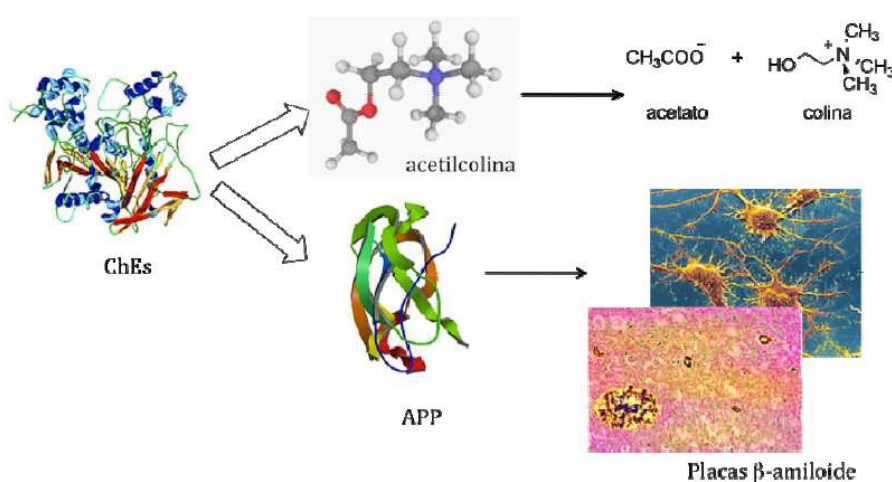
La cantidad de mecanismos patogénicos implicados, los cuales están estrechamente interrelacionados, hacen que la EA sea considerada una enfermedad multifactorial.



Importancia de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la EA

El sistema colinérgico es uno de los sistemas moduladores más importantes de la transmisión neuronal en el cerebro, regulando funciones cognitivas como la memoria, el aprendizaje, la arborización dendrítica y el desarrollo y diferenciación neuronal. Su principal neurotransmisor es la acetilcolina que es degradada a colina y acetato, mediante las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE).

Además, el sistema colinérgico, a través de las enzimas AChE y BuChE, está involucrado en otras funciones no colinérgicas, como la estimulación de la formación de las placas del β -amiloide. Existen estudios que demuestran que a través de su sitio periférico aniónico (PAS), la AChE tiene la capacidad de inducir la formación de fibras $\alpha\beta$, mediante cambios conformacionales que se producen tras su unión al péptido. Así, la AChE actuaría como una especie de “chaperona” (proteína que ayuda al plegamiento de otras proteínas), dando lugar a la creación de estas fibras. Por tanto, el efecto de un inhibidor de AChE a través de su sitio periférico aniónico (PAS), podría conducir a la prevención de la enfermedad, mediante un bloqueo en la formación de estos péptidos.



Hay estudios que sugieren que la butirilcolinesterasa (BuChE), desempeña un papel activo en el proceso de formación de los depósitos de placas β -amiloide. Por

un lado, se ha observado que la BuChE se asocia con las placas en el punto de maduración, donde éstas se transforman de una forma benigna, difusa, a la forma neurotóxica compacta, asociada con la enfermedad patológica. Por otro lado, estudios en ratones han demostrado que los inhibidores selectivos de la enzima butirilcolinesterasa, como la cimserina, causan una inhibición prolongada de la enzima en el cerebro, causando un aumento en los niveles de acetilcolina extracelular, sin provocar efectos inhibidores en la acetilcolinesterasa (AChE). También se ha descrito que en cultivos de células humanas de neuroblastoma, se reduce la

proteína precursora β -amiloide intracelular y extracelular, así como los niveles de péptido β -amiloide secretado, sin interferir en la viabilidad celular.

Además, se ha observado que el contenido de la enzima BuChE en el cerebro aumenta con la edad, mientras que el de la AChE presenta una tendencia inversa. La actividad catalítica de BuChE, por lo tanto, puede desempeñar un papel más destacado en la hidrólisis de acetilcolina en el cerebro envejecido, lo que sugiere que la inhibición de dicha enzima puede tener un mayor impacto sobre la neurotransmisión colinérgica en los ancianos. La presencia de esta enzima en las placas amiloides y marañas neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer (EA), ha sido confirmada ahora por numerosos investigadores. Parece razonable suponer que esta enzima es un producto glial y que su localización en las placas y marañas puede ser el resultado de los procedimientos inflamatorios globales relacionados con la EA. Así, la interferencia con la actividad de esta enzima (catalítica o no catalítica) representa una estrategia terapéutica prometedora para influir en el transcurso de los procedimientos neuropatológicos en la enfermedad de Alzheimer.

Interconexión entre las diferentes rutas fisiopatológicas

- GSK3 β

Se ha observado que en la EA los niveles del factor de transcripción nuclear Nrf2, que regula la expresión de genes de enzimas destoxificantes y antioxidantes, se encuentran disminuidos y que el factor se encuentra en el citosol a pesar de los elevados niveles de estrés oxidativo. Esto es por la implicación de GSK3 β en esta vía detoxificante. Esta enzima es capaz de modular la actividad de Nrf2 a través de dos mecanismos: fosforilando de manera directa o indirecta a Nrf2 favoreciendo su exclusión del núcleo y su degradación. Esto favorece la acumulación de especies ROS y por tanto, incrementa los niveles de estrés oxidativo.

A su vez, la hiperactividad de GSK3 β daña el procesamiento de la proteína APP, incrementando la producción de β A.

Por tanto, la hiperactividad de GSK3 β causa estrés oxidativo y aumenta la formación de las placas seniles.

- Estrés oxidativo

Se ha descrito que el estrés oxidativo produce un aumento de los niveles de β A en células de neuroblastoma humano. Esto es debido a que los compuestos derivados de la peroxidación

lipídica (que aparecen como consecuencia del estrés oxidativo) aumentan la expresión de β -secretasas en neuronas, que darán lugar después a la formación de agregados de β A.

Además, se conoce que el estrés induce la acumulación de la AChE. La actividad de AChE se encuentra incrementada en situaciones de estrés celular (meningiomas, astrocitomas y tumores de glioblastoma, etc).

- Placas β A

Se sabe que β A produce hiperfosforilación de tau: β A inhibe la vía de supervivencia PI3K/Akt, se aumenta la actividad de GSK3 β y, por tanto, la hiperfosforilación de tau y el estrés oxidativo derivado de la inhibición de la vía Nrf2-ARE.

Y a su vez, β A es capaz de coordinar átomos de Fe³⁺ y Cu²⁺ y generar ROS vía química de Fenton. Además, la expresión de Nrf2 se ha visto que protege frente a la neurotoxicidad inducida por β A.

- Acetilcolinesterasa

Además de la función colinesterasa, esta enzima posee otras funciones no esterasas. Se conoce que la Acetilcolinesterasa por su centro aniónico periférico (PAS) media procesos de adhesión celular que favorecen la formación de placas de β A.

Como consecuencia a todo lo anterior, aparece una disminución en la transmisión de acetilcolina, bien por una rápida degradación del neurotransmisor o por destrucción de neuronas colinérgicas. De esto se derivan las causas y síntomas del EA.

En la actualidad el abordaje clínico de esta patología consiste en diversas estrategias:

- Dirigidas a aliviar los síntomas:

- Agonistas selectivos de los receptores M1 centrales (arecolina). Mejoran la memoria y el aprendizaje.
- Inhibidores de la AChEsterasa y BuChEsterasa (aumentar el efecto de la acetilcolina)
- Antagonistas del receptor de glutamato NMDA (memantina).

Estos tratamientos son meramente sintomáticos, por lo que el desarrollo de nuevos fármacos que ralenticen el avance de la enfermedad o incluso la detengan se hace imperativo.

- Dirigidas a las causas de la enfermedad (frenar su avance):



METODOLOGÍA

Se ha realizado una búsqueda en diferentes bases de datos informatizadas y se han obtenido varios artículos bibliográficos que se han utilizado para la realización de la introducción de este trabajo. La base de datos que ha servido para la localización de artículos que fuesen de utilidad en esta revisión bibliográfica ha sido PubMed. También se ha recurrido a la consulta de libros para recabar información.

La metodología experimental empleada para la obtención de los resultados de este trabajo ha consistido en estudiar la estructura biológica de dos enzimas (acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa). Para ello se ha recurrido a la base de datos Protein Data Bank donde hay estructuras cristalográficas disponibles. Del mismo modo, se ha hecho uso de un programa informático para dibujo y diseño de estructuras químicas, ChemSketch, y con él diseñar una molécula capaz de unirse a la estructura diana. Por último, se ha recurrido a programas informáticos para ensayar in silico dicha molécula y predecir su modo de unión a la diana (PyMol, Autodock Tools y Vina).

I. Estudio de la estructura biológica

En primer lugar se realizó la búsqueda de la estructura de la proteína. Dicha estructura debía ser lo más aproximada a la estructura biológica, para que el ensayo fuera lo más real posible. En la base de datos de Protein Data Bank se encontraron diversas estructuras cristalográficas disponibles (obtenidas por Difracción de Rayos X, Radiación Magnética Nuclear o Microscopía Electrónica). Elegimos las estructuras de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en base a algunos criterios:

- aquellas estructuras de enzimas que eran humanas,
- que no habían sido modificadas genéticamente,
- que tenían una resolución menor a 2,5 (mayor exactitud en el estudio computacional)
- y que presentasen un inhibidor ya unido a la proteína. Esto nos ha permitido encontrar el sitio de unión y conocer los puntos de unión necesarios para efectuar dicha inhibición.

En Protein Data Bank se realizó la búsqueda de las dos enzimas según estos criterios. Se han elegido estas dos estructuras cristalográficas:

- PDB-4M0E: estructura de la acetilcolinesterasa humana, obtenida por difracción de rayos X, con una resolución de 2Å. Además, viene incorporado un ligando inhibidor (dihidrotanshinona I).

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More

Showing 1 - 9 of 9 Results

Filter: Check All View: Detailed Download Results

4M0E Structure of **human** acetylcholinesterase in complex with dihydrotanshinone I

Authors: Cheung, J., Gary, E.N., Shiomi, K., Rosenberry, T.L.

Release: 2013-10-16

Experiment: **X-RAY DIFFRACTION** with resolution of **2.00 Å** Residue Count 1084

Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
5 Ligands [Display Full Ligand Details | Display for All Results]

Citation: Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrein (2013) ACS Med Chem Lett 4: 1091-1096 [Display Full Abstract | Display for All Results]

Molecule of the Month: Acetylcholinesterase

- PDB-4BDS: estructura de la butirilcolinesterasa humana, obtenida también por difracción de rayos X, con una resolución de 2,1Å. Viene incluida en la estructura una molécula de tacrina, que es el ligando inhibidor.

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More

4BDS **Human** butyrylcholinesterase in complex with tacrine

Authors: Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., Renard, P.-Y.

Release: 2013-05-29

Experiment: **X-RAY DIFFRACTION** with resolution of **2.10 Å** Residue Count 529

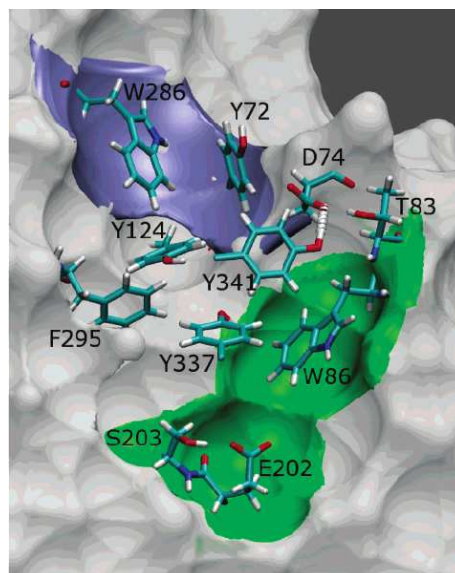
Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
9 Ligands [Display Full Ligand Details | Display for All Results]

Citation: Crystal Structures of Human Cholinesterases in Complex with Huprine W and Tacrine: Drugs Targeting Acetyl- and Butyrylcholinesterase. (2013) Biochem.J. 453: 393 [Display Full Abstract | Display for All Results]

Molecule of the Month: Acetylcholinesterase

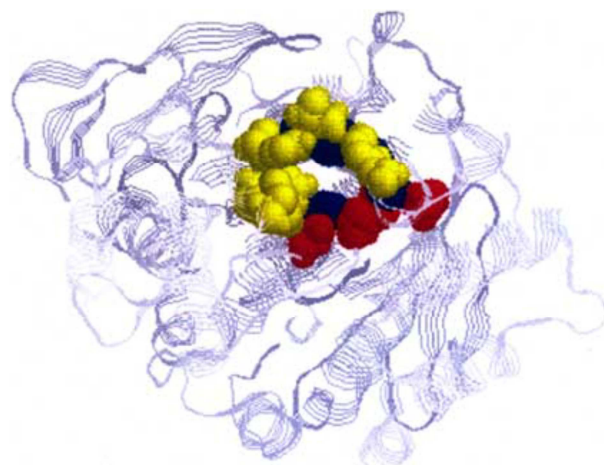
En segundo lugar, estudiamos el sitio de unión PAS. Debemos conocer los residuos responsables de la actividad.

El sitio PAS estaba compuesto por los siguientes aminoácidos:



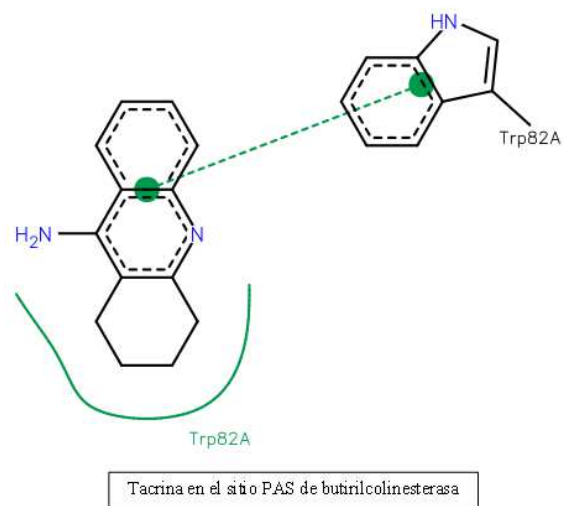
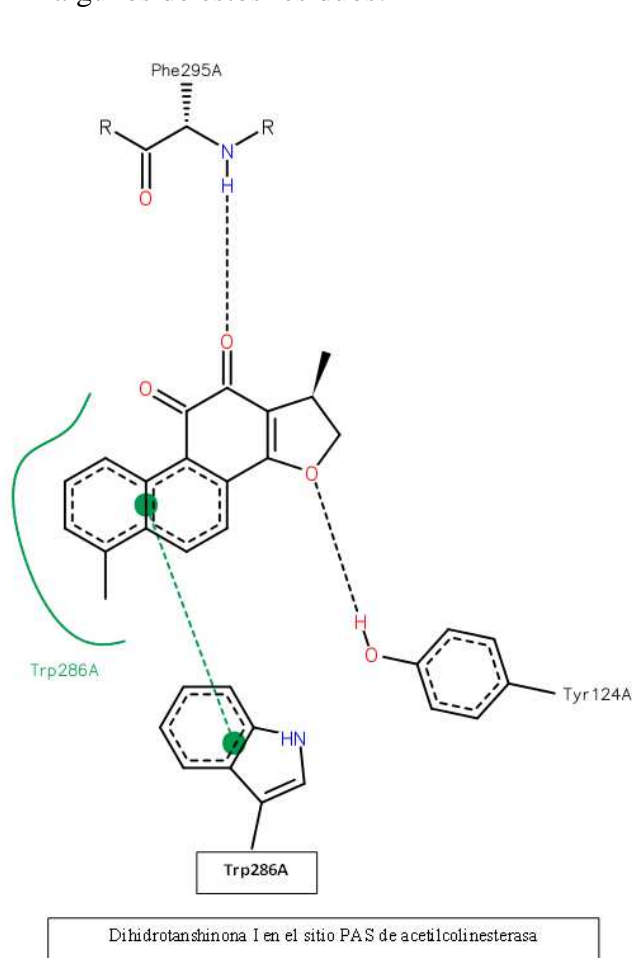
Relación de los aminoácidos involucrados en los Subsitios de la AChE y BuChE.

	Sitio periférico (PAS)	Bolsillo de unión acilo (ABP)	Agujero oxianiónico (OT)	Sitio aniónico (AS)	Triada catalítica (CAS)
AChE	Tyr72 Asp74 Tyr124 Ser125 Trp286 Tyr337 Tyr341	Phe295 Phe297 Trp236 Phe338	Gly121 Gly122 Ala204	Trp86 Tyr133 Glu202 Gly448 Ile451	Ser203 His447 Glu334
BuChE	Asn68 Asp70 Gln119 Thr120 Ala328 Tyr332	Leu286 Val288 Trp231 Phe329	Gly116 Gly117 Ala199	Trp82 Tyr128 Glu197 Met437 Tyr440	Ser198 His438 Glu325



Los diferentes subsitios de ambas enzimas se encontraban muy próximos en el espacio. En el interior (en rojo), el sitio activo; un poco más al exterior (en azul), el sitio aniónico; por último, en la garganta del hueco (en amarillo), el sitio aniónico periférico (PAS).

Observamos que el inhibidor que lleva incorporado cada enzima establecía interacciones con algunos de estos residuos:



- La dihidrotanshinona I se unía al Trp286 y con la Tyr124.
- El inhibidor tacrina interaccionaba con el Trp82, del sitio aniónico, muy próximo al PAS.

Esta dos regiones que se antepoñían al sitio activo (el sitio aniónico y el PAS) eran ricas en residuos muy ácidos, que le conferían a esta zona de un marcado carácter electrónico negativo.

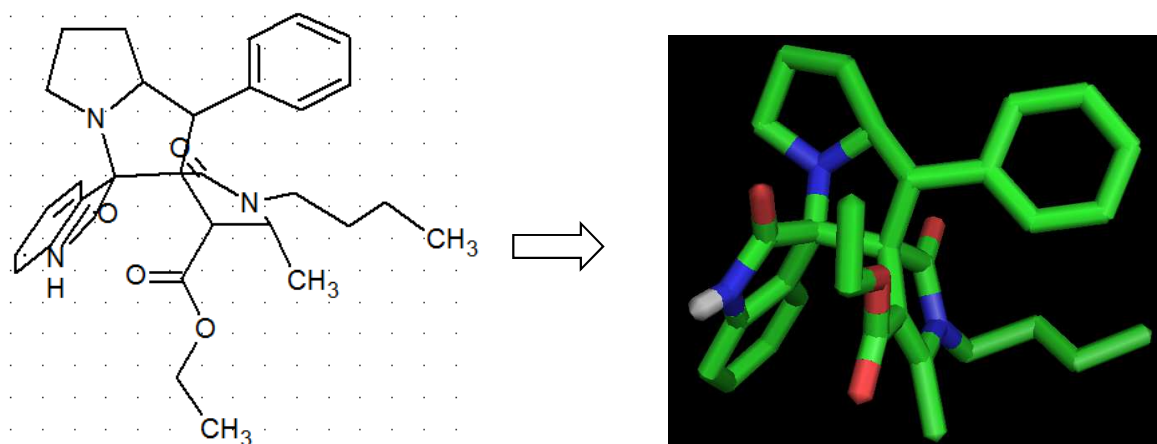
II. Diseño racional

El siguiente paso fue buscar los grupos funcionales que pueden interaccionar con esos residuos y conectarlos entre sí de manera que dichos grupos se adapten a las distancias requeridas. Además, se tuvo en cuenta el espacio del sitio de unión, para que el ligando pudiese acceder, adaptarse y unirse adecuadamente.

El modo de diseñarlos es dibujar virtualmente los grupos funcionales que consideramos van a dar buena interacción. Los grupos que podían unirse a los residuos del sitio PAS eran:

Residuos PAS	Grupos que pueden unirse
Tyr341	Grupos N-H, O-H, fenilo, carbonilo, etc
Tyr377	Grupos N-H, O-H, fenilo, carbonilo, etc
Trp86	Grupo hidrofóbico o cadena carbonada
Tyr124	Grupos N-H, O-H, fenilo, carbonilo, etc
Phe295	Grupo hidrofóbico o cadena carbonada

A continuación se procedió a diseñar (haciendo uso del programa para representar estructuras químicas, ChemSketch) una quimioteca virtual de compuestos.



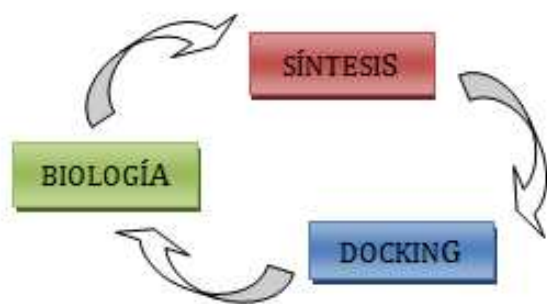
III. Ensayo virtual

Una vez diseñada la molécula, se procede a ensayarla virtualmente para comprobar si realmente se ajusta al sitio y si es factible su unión a los aminoácidos de interés.

Para ello se preparó tanto el ligando como la proteína para que pudieran ser computados por el programa que realiza el estudio computacional o docking (Autodock Vina). Se utilizó el visualizador PyMol y Autodock Tools. Por último, se utilizó el programa Autodock Vina. Además, en Autodock Tools se debe generar una caja con unas coordenadas y dimensiones determinadas, con la que se delimite perfectamente el sitio de unión y parte de los alrededores, para asegurar que se ensaya en todas las regiones del sitio diana.

Para llevar a cabo el estudio computacional se utiliza el Autodock Vina. Éste último es un programa que toma dos archivos, (protein.pdbqt y ligand.pdbqt), y sitúa la molécula que se ha designado como “ligand” dentro de la caja que hemos delimitado, dentro de una región concreta de la molécula “protein.pdbqt”. Lo que va a realizar este programa es ensayar las múltiples combinaciones posibles de la molécula, en todas las regiones del espacio de la caja, en todas las conformaciones posibles de la estructura. Y cada disposición de la molécula se va a ir registrando con unas energía de interacción diferente (en unidades de kcal/mol). Es decir, mide las posibles energías de enlace y asigna una puntuación o score. Después, reordena las nueve mejores colocaciones del ligando, prediciendo la conformación más aproximada a la realidad.

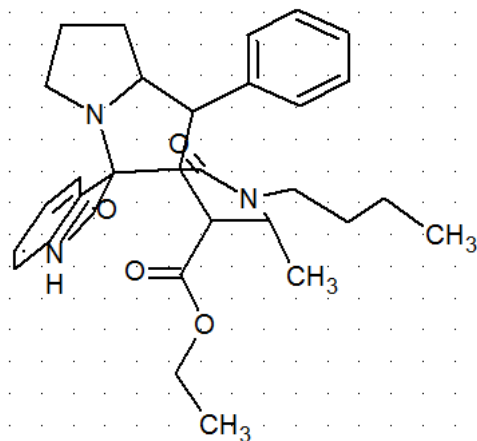
Por todo lo dicho anteriormente, se debe estudiar muy bien la estructura biológica para construir en base a ella un ligando que encaje a medida. Es decir, partimos de la proteína en su estado natural, diseñamos a la medida de la misma y por último se ensaya biológicamente para comprobar que se ha diseñado de forma válida.



Se trata de un ciclo que se ha de repetir las veces que sea necesario. Nos basamos en la estructura biológica para efectuar el diseño y síntesis. Posteriormente ensayamos virtualmente por docking y volvemos a remitir a la estructura biológica para comprobar si corresponden los resultados con la realidad biológica.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Se ha llegado a diseñar un compuesto con un grupo espirooxindol como centro de su estructura. Está compuesto por diferentes grupos:



- N-H del indol, capaz de formar enlace de hidrógeno.
- Nitrógeno pirrolizidínico, muy básico, por el efecto inductivo de los tres carbonos adyacentes hacia sí.
- Carbonilos capaces de aceptar protones (ceder electrones)
- Cadenas carbonadas, tanto lineales como cíclicas, que permiten interacciones hidrofóbicas.

Todos estos grupos contenidos en esta estructura pueden ser capaces de unirse a los residuos que componen el sitio PAS.

Debido a la presencia de algunos residuos ácidos, el sitio PAS y sus alrededores presentan altas cargas electrostáticas negativas. Esta superficie cargada aniónicamente se encuentra en la garganta del sitio de unión.

Este inhibidor ha sido diseñado en función de estas características. Es por ello que presenta en su estructura una amina terciaria protonable (nitrógeno pirrolizidínico) que genera un catión, capaz de interaccionar con el sitio aniónico periférico. Además, presenta cadenas carbonadas capaces de rellenar los huecos hidrofóbicos del sitio PAS.

Tras el ensayo virtual de este compuesto sobre la proteína, se han obtenido los siguientes resultados:

Figura 1. Se observa cómo el nitrógeno pirrolizidínico interacciona con el hidrógeno del hidroxilo del Trp124. Debido a su carácter básico, acepta el hidrógeno con facilidad. Se carga por tanto positivamente y establece un enlace iónico con el oxígeno que ha cedido el hidrógeno.

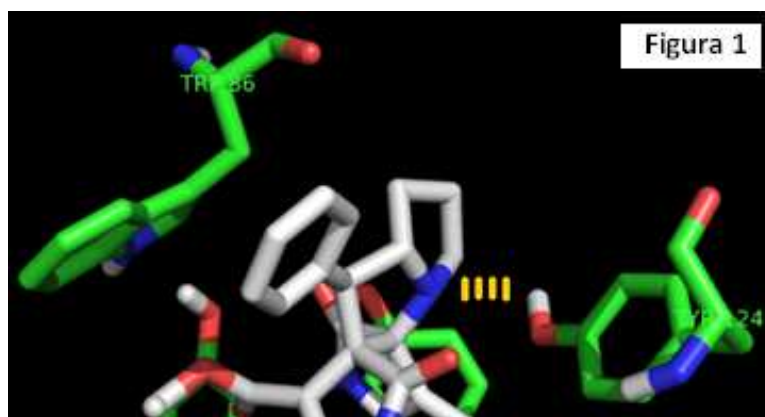
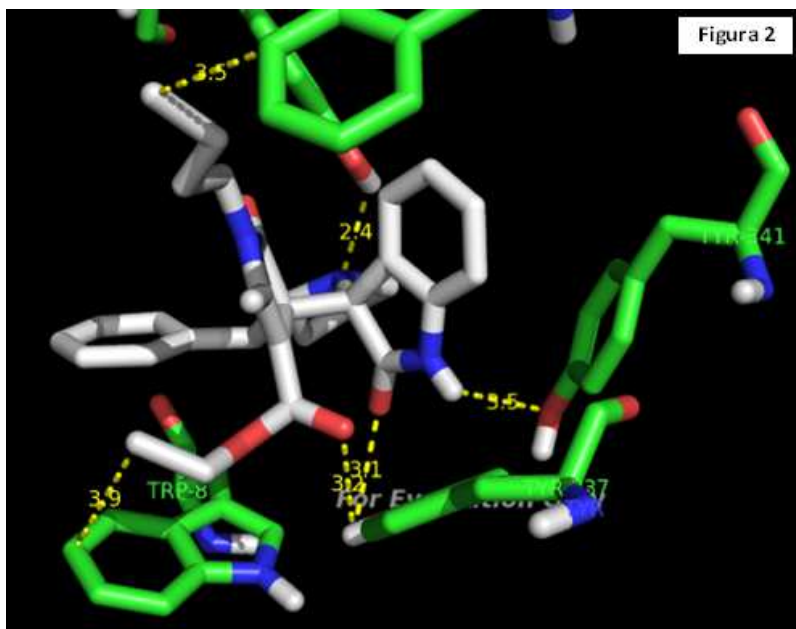


Figura 2. Podemos observar varias interacciones:

- A la derecha, se aprecia la interacción del oxígeno de la Tyr341 con el hidrógeno del grupo indol de la molécula diseñada.



- En el centro, la unión de los dos carbonilos con el hidrógeno del hidroxilo de la Tyr337.

- A la izquierda, abajo, se puede observar una interacción hidrofóbica entre el fenilo del Trp86 y el grupo metilo del grupo éster. También se aprecia este tipo de interacción en la parte de arriba de la figura 2, donde se puede observar cómo

un radical butilo se acomoda en el bolsillo hidrofóbico que se encuentra delimitado por la Phe295.

Como hemos comentado anteriormente, los residuos implicados en la actividad de PAS son:

	Sitio periférico (PAS)	Bolsillo de unión acilo (ABP)	Agujero oxianiónico (OT)	Sitio aniónico (AS)	Triada catalítica (CAS)
AChE	Tyr72 Asp74 Tyr124 Ser125 Trp286 Tyr337 Tyr341	Phe295 Phe297 Trp236 Phe338	Gly121 Gly122 Ala204	Trp86 Tyr133 Glu202 Gly448 Ile451	Ser203 His447 Glu334
BuChE	Asn68 Asp70 Gln119 Thr120 Ala328 Tyr332	Leu286 Val288 Trp231 Phe329	Gly116 Gly117 Ala199	Trp82 Tyr128 Glu197 Met437 Tyr440	Ser198 His438 Glu325

Y nuestro ligando establece interacciones con los siguientes residuos:

- Tyr124 (PAS)
- Tyr337 (PAS)
- Tyr341 (PAS)
- Y establece uniones adicionales

de tipo hidrofóbico con zonas

adyacentes al sitio PAS como son el Trp86 (sitio aniónico) y la Phe295 (bolsillo de unión acilo).

Con este ensayo lo que podemos afirmar es que la molécula diseñada se adapta a a los requerimientos electrónicos y topológicos del sitio de unión.

Al unirse en el sitio PAS, donde se unen otros inhibidores, y al estar la proteína cristalizada en su conformación inactiva, podemos decir que estos compuestos se unirán bien a este lugar y en esa conformación, favoreciendo la conformación inactiva del enzima.

Incluso en algunos casos las energías de unión son mayores que otros inhibidores ya ensayados, por lo que se podría decir que serán más activos y por tanto más eficaces. Esta mayor energía de unión puede ser debida a las interacciones hidrofóbicas adicionales que establece con los sitios adyacentes al sitio PAS.

CONCLUSIONES

- Se ha descrito el diseño de fármacos basado en la estructura, así como los métodos que se utilizan para llevarlo a cabo.
- Se ha realizado una breve revisión bibliográfica de la etiología de la enfermedad del Alzheimer y de las estrategias terapéuticas actuales.
- Se ha diseñado un inhibidor dual de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en función de la estructura del centro activo. Es interesante dicha inhibición porque se podría conseguir con un único fármaco detener el avance de la enfermedad, al disminuir la formación de βA , y tratar los síntomas, al aumentar el tiempo de acción de la acetilcolina.
- El diseño de fármacos basado en la estructura es un buen método para diseñar una quimioteca de compuestos, simplificando enormemente las tareas de búsqueda de posibles compuestos activos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kalyaanamoorthy S, Chen Y-PP. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov. Today*. **2011**, 16, 831-839.
2. Leach, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications. Editorial Pearson Education, 2001.
3. Gameiro Ros I. M, León Martínez, R. Trabajo Fin de Máster. Máster en Investigación Farmacológica. Universidad Autónoma de Madrid, 2010.
4. Sánchez-Chávez G, Salceda R,. Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *REB* **2008**, 27 (2), 44-51.
5. González Naranjo P. J. Una nueva estrategia basada en el diseño de fármacos multidiana para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2013.
6. Cheung J, Gary E. N., Shiomi K., Rosenberry T. L. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 1091-1096.
7. Nachon F., Carletti E., Ronco C., Trovaslet M., Nicolet Y., Jean L., Renard P. Y.. Crystal Structures of Human Cholinesterases in Complex with Huprine W and Tacrine: Elements of Specificity for Anti-Alzheimer'S Drugs Targeting Acetyl- and Butyrylcholinesterase. *Biochem. J.* **2012**, 453, 393-399.
8. Johnson G, Moore S. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Curr. Pharm. Design.* **2006**, 12, 217-225.
9. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455-461.